

## 양식장 배출수 퇴적층에서 분리된 리파아제 생산 박테리아의 동정 및 배양학적 특성

김만철 · 장태원 · Ramasamy Harikrishnan · 장익수 · 여인규 · 정준범 · 허문수\*  
제주대학교 해양과학부

제주 연안 양식장 배출수 퇴적층으로부터 미생물 배양 배지를 사용하여 총 200여 균주를 분리하였으며, 분리된 균주를 이용하여 olive oil이 함유된 평판배지에서 투명환을 형성하는 균주를 분리하였고, 이를 LI-68, LI-80로 각각 명명하였다. 분리 균주 LI-68, LI-80의 BIOLOG를 이용한 생화학적 분석 특성 및 16S rDNA의 염기서열 분석 결과 *Janibacter anophelis*와 99%의 유전적 상동성을 보여 최종적으로 *Janibacter* sp. LI-68, *Janibacter* sp. LI-80으로 동정되었다. 분리 균주 *Janibacter* sp. LI-68과 *Janibacter* sp. LI-80의 증식을 위한 최적 배양온도를 확인하고 증식온도에 따른 지방분해효소 활성의 변화를 조사하였으며, 이를 위하여 배양온도를 20°C에서 40°C까지 10°C 간격으로 배양하여 균체의 증식과 분비되는 지질분해 효소의 활성을 조사하였다. 그 결과 분리균주 *Janibacter* sp. LI-68는 30°C 배양실험구에서 가장 높은 균 생육도를 나타냈으며, 효소활성은 균 생육도와는 다른 40°C에서 가장 높은 효소활성을 보였다. 반면 *Janibacter* sp. LI-80 균주는 30°C에서 가장 높은 균 생육도를 보였으며, 효소활성은 균 생육도와 반비례하여 40°C에서 가장 높은 효소활성을 보였다.

**Key words** □ 16S rDNA, *Janibacter* sp., lipase, marine sedimentary layer

지방분해효소(Lipase)는 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산으로 분해하거나 또는 역으로 합성하는 작용을 하는 효소로 동물, 식물, 미생물에 의해 생산되지만, 특히 미생물이 생산하는 지방분해효소는 효소적인 특징이나 안정성, 기질특이성 등의 이유로 다양한 산업에 응용할 수 있는 장점이 있다(19, 22). 또한 지방분해효소는 아실글리세롤의 카르복실에스테르결합을 가수분해하여 지방산과 글리세롤을 만드는 효소(2, 7)로서 이 효소는 동물의 체액에서 처음으로 발견된 이래, 동물의 폐, 신장, 부신, 지방조직, 태반 등과 식물의 밀이나 아주까리, 콩 등의 종자 내에 존재함이 밝혀졌다(10). 미생물이 생산하는 지방분해효소는 2개의 군으로 나뉘는데, 제 1군은 비특이성 지방분해효소로 3개의 glycerol ester 위치에 구분없이 가수분해하는 것으로, *Geotrichum candidum*, *Staphylococcus aureus*, *Humicola lanuginosa* 등이 생산하는 효소가 이에 속한다(12). 제 2군은 특이성 지방분해효소로 triglyceride의 1-, 2- 위치의 ester 결합을 분해하여, mono-, diglyceride를 생성한다. 그러나 가끔은 1-, 3- 위치를 분해하여, 2-monoglyceride와 1, 2- 또는 2, 3-diglyceride를 생성하기도 하나 이는 안정하지가 못해서, acyl group의 전위에 의해, 결국 1-monoglyceride와 1, 3-diglyceride를 생성하게 된다. 따라서 반응시간이 길어지면 triglyceride의 3개 위치가 모두 분해될 수 있다. *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delema*, *Pseudomonas* sp.가 생산하는 효소가 이 군에 속한다(5,

8, 21).

특히 *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*)가 생산하는 지방분해효소는 수용성환경과 비수용성 환경에서 우수한 효소활성을 나타내어 biocatalyst로서의 이용가능성이 증대되고 있다(15).

미생물성 지방분해효소는 racemic 혼합물의 가수분해나 에스테르와 펩타이드의 합성, 지방산의 생산과 가수분해, 식품이나 세제 첨가제 등 그 응용 범위가 매우 다양하여 미생물성 지방분해효소의 공업적 이용에 관한 연구들이 활발히 진행 중이다(1, 13). 지방분해효소의 기능은 지방의 가수분해이지만 반응조건에 따라 지방 이외의 다양한 에스테르 화합물의 가수분해를 수행할 수 있을 뿐만 아니라, 에스테르 합성반응과 트랜스에스테르화 반응 등 다양한 화학반응을 촉매할 수 있기 때문에 각종 산업에서 널리 사용되고 있다. 미생물이 생산하는 지방분해효소는 다양한 기질특이성, 위치특이성, 입체특이성 등의 유용한 반응 특성을 지니고 있다. 이러한 넓은 기질특이성과 높은 입체이성질체에 대한 선택성을 이용하여 가수분해반응, 에스테르화반응 및 트랜스에스테르화 반응으로서 다양한 연구가 이루어졌다(6, 18).

최근에는 해양미생물 및 생물자원에 많은 주목을 받고 있는데 이는 육상미생물과는 달리 아직까지 연구가 많이 이루어지지 않았으며, 저온성, 빈영양성, 친압성, 호염성 등의 특성을 갖고 있기 때문이다. 특히, 대부분의 해양미생물은 생육환경이 육상 미생물과는 다르기 때문에 생산되는 2차 대사산물 또한 더욱더 다양하게 분포하고 있다(3, 4, 11). 제주도는 약 300여 개 이상의 육상수조식 수산 어류 양식장이 분포하고 있으며, 사료의 부산물

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-64-754-3473, Fax: 82-64-756-3493  
E-mail: msheo@cheju.ac.kr

들의 제주 연안에 많이 유출이 되어 지역 연안 어장에 많은 오염을 야기하고 있으며, 양식장 배출수 연안 퇴적층에는 사료부산물들이 쌓이면서 많은 효소 생산 박테리아들이 많이 존재하고 있다.

따라서 본 연구는 육상수조양식장 배출수 부근의 퇴적층으로부터 지방분해효소 생산 미생물 탐색 및 확보와 양식장 주변 해양생태계에 대한 기초 자료를 제시하고 차후 유용균주를 이용한 산업적인 응용방안을 모색하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 해양미생물 균주의 분리

본 연구에 사용된 균주는 제주도 양식장 배출수 연안에 형성된 퇴적층으로부터 분리되었으며, 멸균된 모종삽을 이용하여 퇴적층을 멸균 위생팩에 시료를 넣고 채집 후, 4°C를 유지하면서 실험실로 운반하여 실험에 이용하였다. 채집된 퇴적층 1 g을 멸균해수 9 ml에 넣고 충분히 섞어준 후, 이 시료를 원액으로 10 단까지 희석하여 6,7,8,9단을 각각의 멸균된 배지에 100 µl씩 접종하고 25°C에서 7일간 배양하였다.

중속영양세균의 분리와 배양은 Marine agar (MA; Difco Co., USA) 배지, 성장속도가 느린 세균의 배양은 R2A agar (Difco Co., USA) 배지, 영양이 풍부한 일반적인 배지로 일반세균의 배양을 Nutrient agar (NA; Difco Co., USA) 배지, 효모, 곰팡이 또는 내산균의 배양은 YM agar (Difco Co., USA) 배지를 사용하여 균주를 분리하였다.

### Lipase 생산 미생물 분리

높은 지방 분해효소를 생산하는 균종을 분리할 목적으로 연안 퇴적층에서 분리된 200균주를 이용하여 지질 분해능 측정 실험에 이용하였다. 본 실험의 경우 1% olive oil과 0.001% Rhodamin B (Sigma Co., USA)를 첨가한 NA 배지를 멸균해수를 이용하여 제조한 후, 각각의 분리된 균종을 백금이를 이용하여 도말하고, 25°C에서 48시간 배양 후, UV 관찰을 통해 자라난 콜로니 주변에 투명환(clear zone)을 형성하는 균주를 분리하여 본 연구에 이용하였다.

### 분리균주의 생화학적 특성 분석

분리균주의 생화학적 특성 분석은 3%로 KOH를 이용하여 간 이그람동정을 한 후, Biolog 사(Biolog Inc., USA)의 GN2, GP2 Plate를 이용하여 95가지의 기질이용 특이성을 시험하였으며, 분석은 MicroLog™ system (release 4.05) program을 이용하였다. 순수 분리된 균주를 BUGM (Biolog Inc., USA) 사면배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후, 현탁하여 탁도계(Biolog 21907, USA)를 이용하여 균주 현탁액을 각각 GP의 경우 20%, GN의 경우 52~59%가 되도록 조절한 후 GP2와 GN2 Micro plate의 각 well에 150 µl씩 접종한 후, 30°C에서 24시간 배양 후 보라색을 발색되는 well을 양성으로 판정하였다. 이때 현탁액은 NaCl 150 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 51 g, KCl 3.7 g을 증류수 912 ml

에 녹인 MCS stock solution (14)을 증류수로 10배 희석한 후, 멸균하여 사용하였다.

### Lipase 생산 균주의 동정

분리 균주의 동정을 위해 16S ribosomal DNA 염기서열을 이용하였으며, 16S rDNA 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭하여 염기 서열을 결정하였다. PCR 반응에 사용된 primer는 27F (forward primer; AGAGTTGATCCTGGCTCAG), 1492R (Reverse primer; GGTTACCTTGTACGACTT)를 사용하였고, ABI 3730XL capillary DNA Sequencer를 이용하여 염기서열분석을 하였으며, 염기조성, 상호비교(pairwise comparisons)를 위한 염기치환 양상, codon usage 및 각 개체·개체군의 유전자 차이는 MEGA 3.0 프로그램으로 계산되었으며, 미생물 군집 분석에 이용된 계통수는 distance 방법으로 MEGA 3.0 (9) 프로그램의 Pair-distance를 이용하여 작성하였다. 분리균주 Strain LI-68, LI-80의 16S rRNA PCR 증폭을 통해 얻은 염기서열을 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 염기서열을 분석하였으며, 결정된 염기서열을 NCBI BLAST를 이용하여 GenBank에 보고된 균주와의 상동성을 조사하였다. 또한 분리균주의 염기서열 결과를 GenBank 기탁하여 GenBank submission number를 부여받았다.

### Lipase 생산 미생물의 온도별 성장 측정 및 lipase 활성 측정

Lipase 활성이 확인된 균주를 Marine broth (MB; Difco Co., USA)에 배양 후, 각각의 시간대별(3, 7, 12, 24, 48, 72, 96 h)로 배양액을 1 ml씩 취하여 분광광도계를 이용하여, 660 nm에서 성장도 및 lipase 활성을 측정하였다. 균주의 lipase 활성을 측정하기 위하여 배양액을 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였으며, 기질과 결합된 p-nitrophenol (pNP)이 효소에 의해 유리되는 양을 흡광도의 변화로 측정하는 microplate assay 방법(20)으로 측정하였다.

Microplate assay는 p-nitrophenyl-ester (pNP-ester)를 기질로 사용하여 유리되는 p-nitrophenol의 양을 분광광도계를 이용한 405 nm에서 흡광도 증가량으로 측정하였다. 효소의 활성은 조효소액 100 µl가 1분 동안 1 µg의 tyrosine을 생성할 때를 1 unit으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 지질 분해 미생물 분리 및 동정

제주 연안 양식장 배출수 퇴적층에서 MA 배지, R2A agar 배지, NA 배지, YM agar 배지를 사용하여 총 200여 균주를 분리하였으며, 분리된 균주를 이용하여 olive oil이 함유된 평판배지에서 투명환(clear zone)을 형성하는 균주를 분리하였고, 이를 LI-68, LI-80로 각각 명명하였다.

분리 균주 LI-68, LI-80의 생화학 특성을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. 분리균주 LI-68는 그람양성균으로 판명되었으며, 배지상에서의 콜로니 성상은 구균에 가장 가까웠으며, 운동성은

없고, Oxidase test 결과 양성으로 판명되었다. 생화학적 특성을 확인해 본 결과 dextrin, glycogen, N-acetyl-D-glucosamine, amygdalin, arbutin, D-cellobiose, D-fructose,  $\alpha$ -D-glucose, D-mannitol, D-mannose, maltose, salicin, D-sorbitol, sucrose, turanose, L-glutamic acid, glycerol, pyruvic acid 등의 탄수화물이 대사되었음을 확인하였으며(Table 1), 분리균주 LI-80은 그람 양성균의 운동성이 없으며, 배지상에서 콜로니 성상은 구균에 가까웠으며, Oxidase test 결과 양성으로 판명되었으며, Tween 40, Tween 80,  $\alpha$ -D-Glucose, Maltose, Sucrose, Turanose, Acetic acid, L-Malic acid, Pyruvic acid, L-Serine등을 대사하는 것으로 확인되었다.

분리균주 LI-68, LI-80의 NCBI 유전자 염기서열 분석결과 참고균주 *Janibacter anophelis*와 99%의 유전적 상동성을 보였으며, 균주 LI-68과 LI-80은 배지상에서의 형태적인 성상 및 생화학적 특성이 다르게 나타나 최종적으로 각각 *Janibacter* sp. LI-68, *Janibacter* sp. LI-80으로 명명하였다(Fig. 1). 또한 GenBank에 균주 염기서열 정보를 기탁하여 분리균주 *Janibacter* sp. LI-68, *Janibacter* sp. LI-80의 GenBank submission number를 각각

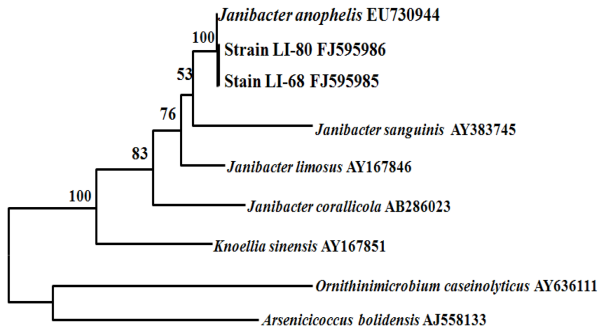
FJ595985, FJ595986으로 부여받았다.

#### 분리균주의 배양 온도에 따른 생육도 및 효소 활성의 영향

분리 균주 *Janibacter* sp. LI-68과 *Janibacter* sp. LI-80의 증식을 위한 최적 배양온도를 확인하고 증식온도에 따른 다당 분해 효소 활성의 변화를 조사하였으며, 이를 위하여 배양 온도를 20°C에서 40°C까지 10°C간격으로 배양하여 균체의 증식과 분비되는 지질분해 효소의 활성을 조사하였다. *Janibacter* sp. LI-68 균주는 배양온도가 20°C인 실험구에서 48시간의 유도기를 거친 후, 48시간 이후에 대수기로 접어들었으며, 최대 생육도는 72시간대로 나타났다. 또한 40°C 배양실험구에서는 유도기 시간이 20°C와 유사하게 나타났으나, 최종적인 균체의 생육도는 20°C 배양실험구보다는 월등히 높았다. 반면, 30°C 배양실험구에서는 유도기가 12시간으로 나타났으며, 이후 대수증식기를 거쳐 48시간대에 최대 생육도를 보였다, 최종적으로 균주 *Janibacter* sp. LI-68은 30°C에서 균 생육도가 가장 높게 나타나 30 정도가 최적 배양 온도인 것으로 사료된다(Fig. 2). *Janibacter* sp. LI-80 균주의 경우 배양온도가 20°C일 때 48시간의 유도기를 거친 후

**Table 1.** Phenotypic properties of strain LI-68, LI-80, and the type strains of other *Janibacter* species

Characteristic	Strain LI-68	Strain LI-80	<i>J. limosus</i> DSM 11140 <sup>T</sup>	<i>J. terrae</i> DSM 13876 <sup>T</sup>
Color of colonies	Cream or White	Cream or White	Cream	White
Morphology	Cocci	Cocci	Cocci, rods	Cocci
Gram-staining	+	+	+	+
Oxidase	+	+	-	W
Motility	-	-	-	-
Optimum salinity range (% NaCl)	2~5	2~5	2~10	ND
Optimum pH value for growth	7~8	7~8	ND	ND
Optimum temperature range (°C)	30~40	30~40	28~37	28~37
Decomposition of				
Casein	ND	ND	+	+
Tween 80	-	+	+	+
Tween 40	-	+	+	+
Tyrosine	ND	ND	+	+
Utilization of				
Acetate	-	+	+	+
D-Fructose	+	-	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
I-Inositol	-	-	W	+
D-Maltose	+	+	+	-
D-Mannose	+	-	W	+
Sucrose	+	+	+	+
2-Oxoglutarate	ND	ND	-	+
N-Acetyl- D-glucosamine	+	-	ND	ND
Dextrin	+	-	-	ND
D-Ramffinose	-	-	ND	ND



**Fig. 1.** Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain LI-68, LI-80, and member of the *Janibacter* sp. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1,000 resampled database. *Ornithinimicrobium caseinolyticus*, *Arsenicococcus bolidensis* was used as an outgroup. Bar, 0.005 nucleotide substitution per position.

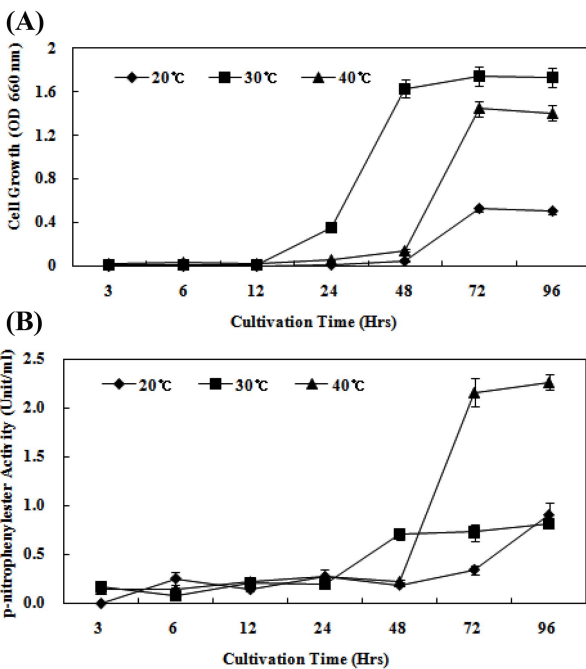
72시간대에 가장 높은 균 생육도를 보였다. 그리고 30°C, 40°C 배양실험구인 경우 유도기가 각각 24시간으로 나타났으며, 이후 대수증식기로 접어들어서는 40°C 배양에서 가장 높은 균 생육도와 빠른 성장을 보이는 것으로 나타났다. 최종적으로 본 균주는 30°C에서 가장 높은 균주의 생육도를 보임으로써, 위에 나타난 LI-68 균주와는 같은 양상의 균주 성장도를 확인하였다(Fig. 3). 분리 균주 *Janibacter* sp. LI-68, *Janibacter* sp. LI-80의 배양시간에 따른 효소활성이 변화를 Fig. 4, Fig. 5에 각각 나타내었다.

*Janibacter* sp. LI-68 균주는 모든 배양온도 실험구에서 24시간 대까지는 lipase 활성이 약하게 나타났으나, 24시간을 기점으로

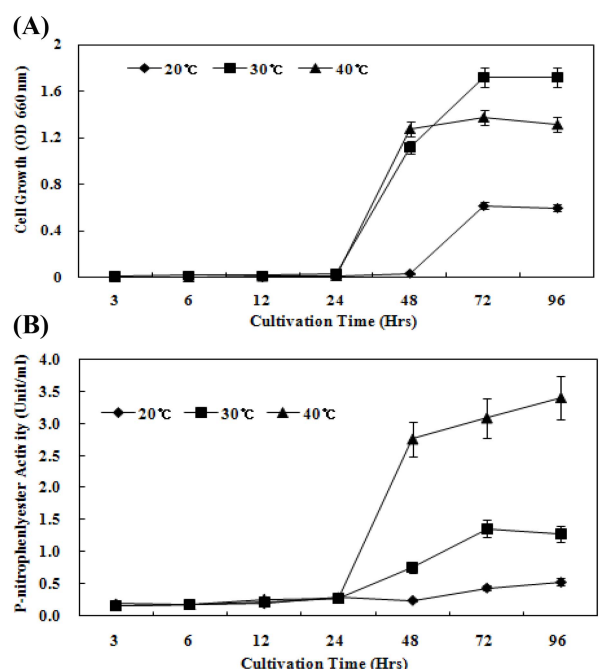
하여 30°C, 40°C 실험구에서 점차 증가하는 양상의 효소 활성을 보였으며, 특히 40°C 배양실험구에서는 48시간 배양시간을 기준으로 급격한 증가를 보여면서 배양 96시간에서 가장 높은 lipase 활성을 나타냈다(Fig. 2). 따라서 *Janibacter* sp. LI-68 균주는 30°C에서 최고의 균주 생육도를 보이지만, 효소활성은 40°C에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 균주의 생육도와 효소활성이 다른 양상으로 나타난다는 것을 보여주고 있는 것으로서, 이러한 결과는 박 등(17)이 효모균주를 이용한 lipase의 활성연구에서도 비슷한 결과를 보였는데, 온도가 높아질수록 생육도는 떨어지고 효소활성은 높아지는 양상을 보인다는 연구결과와 유사하게 나타났다.

*Janibacter* sp. LI-80 균주의 경우도 *Janibacter* sp. LI-68 균주와 유사한 활성을 보이는 것으로 나타났다. 모든 실험구에서 24시간 배양까지는 lipase 활성이 거의 나타나지 않았지만, 배양시간 24시간을 기준으로 30°C 실험구와 40°C 실험구에서는 점차적으로 효소활성이 증가하는 양상을 보였다. 특히 40°C 배양실험구에서는 48시간부터 계속적으로 증가하여 96시간대에 가장 높은 lipase 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 *Janibacter* sp. LI-68 균주와 약간 다른 특징을 보이는데, *Janibacter* sp. LI-80 균주 또한 생육도는 30°C에서 가장 높게 나왔으며(Fig. 3), 효소활성은 40°C 배양실험구에서 높게 나타났다. 이는 분리균주 모두 *Janibacter* sp. 종들의 특징적인 부분이라고 사료되어진다.

지금까지 *Janibacter* 균들이 생산하는 리파아제 효소에 대해서는 아직 전혀 보고 되어 있지 않다. 그렇지만 갯벌에서 분리된 *Psychrobacter* sp. S3 균으로부터 저온성 리파아제 효소생산(11), 효모균주로부터의 리파아제 생산(17), *Burkholderia* sp. HY-10 균주로부터의 리파아제 생산(16), 저온성 세균인 *Pseudomonas* sp.



**Fig. 2.** Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth (A) and p-nitrophenylester activity (B) of *Janibacter* sp. LI-68.



**Fig. 3.** Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth (A) and p-nitrophenylester activity (B) of *Janibacter* sp. LI-80.

YJ103의 지방분해효소에 관한 연구(8) 등 많은 연구가 이루어지고 있으며, 차후 본 균주의 최적 배양 조건 및 물질 정제와 같은 연구를 추가적으로 수행되어야 할 것으로 사료되며, 해양유래 세균을 이용한 산업적 및 환경적인 측면에서 많은 응용가능성이 높을 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. Bjorkling, F., S.E. Godtfredsen, and O. Kirt. 1991. The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9, 360-363.
2. Desnuelle, P. 1972. The lipases, pp. 575-616. In P.D. Boyer (ed.) Academic Press, New York and London.
3. Feller, G., E. Narinx, J.L. Arpigny, M. Aittaleb, E. Baise, S. Genicot, and C. Gerday. 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 189-202.
4. Herbert, R.A. 1992. The perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol.* 10, 395-402.
5. Iwai, M., S. Okumura, and Y. Tsujisaka. 1975. The comparison of the properties of two lipases from Penicillin cyclopium westring. *Agri. Biol. Chem.* 39, 1063-1070.
6. Jaeger, K.K., H.J. Choi, M.H. Kim, C.B. Sohn, and T.K. Oh. 2002. Expression and characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim. Biophys. Acta.* 1583, 205-212.
7. Jaeger, K.E., S.W. Dijkstra, and M.T. Reetz. 1999. Bacterial biocatalysis: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipase. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315-351.
8. Kim, J.W., S.Y. Shim, and S.S. Yoon. 1997. Isolation and purification of a lipase from *Pseudomonas* sp. YJ103 isolated from raw milk. *Kor. J. Dairy Sci.* 19, 17-24.
9. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. Mega 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 5, 150-163.
10. Lee, J.M., R.S. Kim, B.O. Kim, Y.D. Park, and I.N. Jin. 1993. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain producing an extracellular alkaline lipase catabolically regulated by glucose, and purification of the Lipase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 161-168.
11. Lee, S.A., J.H. Lee, S.J. Kim, and H.K. Kim. 2005. Hydrolysis of triglyceride with cold-adapted lipase of *Psychrobacter* sp. S3 isolated from intertidal flat. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 29-34.
12. Liu, W.A., T. Beppu, and K. Arima. 1973. Substrate specificity and mode of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agri. Biol. Chem.* 37, 1349-1355.
13. Malcata, F.X. 1996. Engineering of/with lipases: Scope and strategies, pp. 1-16, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
14. Noble, L.D. and J.A. Gow. 1998. The effect of suspending solution supplemented with marine cations on the oxidation of Biolog GNMicroPlate™ substrates by *Vibrionaceae* bacteria. *Can. J. Microbiol.* 44, 251-258.
15. Otero, C., M.A. Berrendero, F. Cardenas, E. Alvarez, and S.W. Elson. 2005. General characterization of noncommercial microbial lipase in hydrolytic and synthetic reactions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120, 209-223.
16. Park, D.S., H.W. Oh, K.S. Bae, H.M. Kim, S.Y. Heo, N.J. Kim, K.Y. Seol, and H.Y. Park. 2007. Screening of bacteria producing lipase from insect gut: Isolation and characterization of a strain, *Burkholderia* sp. HY-10 producing lipase. *Kor. J. Appl. Entomol.* 46, 131-139.
17. Park, M.H., H.J. Ryu, and K.K. Oh. 2004. Isolation of lipase producing yeast and optimization of cultivation condition. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 19, 148-153.
18. Reetz, M.T. 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 145-150.
19. Ren, T.J., F. Frank, and G.L. Christen. 1988. Characterization of lipase of *Pseudomonas fluorescens* 27; Based on fatty acid profiles. *J. Dairy Sci.* 71, 1432-1438.
20. Ryu, H.S., H.K. Kim, W.C. Choi, M.H. Kim, S.Y. Park, N.S. Han, T.K. Oh, and J.K. Lee. 2006. New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 321-326.
21. Sztajer, H. and E. Zbojnski. 1988. Microbial lipase in biotechnology. *Acta Biotechnol.* 2, 169-175.
22. Taipa, M.A., M.R. Aires-Barros, and J.M.S. Cabral. 1992. Purification of lipase. *J. Bacteriol.* 26, 111-142.

(Received December 3, 2008/Accepted February 16, 2009)

### ABSTRACT : Identification and Cultural Characterization of Lipase Production Bacteria Isolated from Pond Effluent Sedimentary Layer

Man-Chul Kim, Tae-Won Jang, Ramasamy Harikrishnan, Ik-Soo Jang, In-Kyu Yeo, Joon-Bum Jeong, and Moon-Soo Heo\* (Faculty of Marine Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea)

From the course of screening of useful enzyme producing microorganism from marine sedimentary layer, we isolated 2 lipase producing strains and their lipase producing activities were tested. 16S rDNA sequence analysis showed that they were Gram-positive bacteria grouped on *Janibacter* sp. An excellent lipase producing strain, *Janibacter* sp. LI-68 and *J. sp.* LI-80 identified by 16S rDNA analysis and biochemical methods (BIOLÓG), was further studied its lipase producing characteristics. The optimum initial pH, temperature and the optimum cultural time for the enzyme production on MA medium were 8, 30~40°C and 96 h, respectively.